

# Down症候群児の尿中遊離アミノ酸

平野久美子・多田日出子

## On the Free Amino Acids in the Urine of Children with Down's syndrome

BY KUMIKO HIRANO AND HIDEKO TADA

### はじめに

Down 症候群は、その顔貌が mongolian に似ている精神薄弱症で、1866年 L. Down<sup>(1)</sup> がはじめて記載し、以来症候群的な研究は枚挙にいとまないが、1959年 J. Lejeune<sup>(2)</sup>、Jacobs<sup>(3)</sup> 等が、相次いで No. 21の常染色体が余分にあることを発見した。近年になって、No. 21の染色体の異常に関しては、種々の形式のあることがわかってきたが、とにかく本症は染色体数の異常に主原因の存することが明らかとなった。

一方、尿中遊離アミノ酸排泄像の検索は、諸種の疾患における代謝異常の発見、診断、あるいは遺伝学的研究の一手段として重要視され、アミノ酸代謝を中心とした病態生化学的検討を加えようとする試みが、盛んに行われるようになった。精神薄弱児における尿中遊離アミノ酸排泄像についての研究は数多く報告<sup>(4) (5) (6)</sup>され、Phenylketonuria<sup>(7)</sup>やMaple syrup urine disease<sup>(8)</sup> Argininosuccinicaciduria<sup>(9) (10)</sup>等アミノ酸代謝異常を伴う精薄がかなり知られている。しかし Down 症候群児におけるアミノ酸尿に関する報告は意外に少く、またその他の生化学的な欠陥についても、現在ほとんどわかっていないが、染色体数に異数性のある時は、そこに何か酵素の過剰あるいは欠損、蛋白質のアミノ酸配列の異常、ひいてはアミノ酸代謝の乱れが当然考えられる。

Wright と Fink<sup>(11)</sup> は Down 症候群児において、 $\beta$ -アミノイソ酪酸排泄者の頻度が、正常者やその他の精薄者に比べて高いと報告した。これはその後の研究<sup>(12) (13)</sup>で否定され、正常人と変わらないことが示されたが、他に、尿中タウリンが、Down 症候群児では有意に低いことが報告<sup>(13) (14)</sup>されている。また Down 症候群児ではトリプトファン代謝に欠陥があり、キサンツレン酸や5-オキシインドール醋酸の尿中排泄が減少することが報告<sup>(15) (16)</sup>されている。

私達は数年来、薄層クロマトグラフィーを用いて尿アミノ酸分析を行っているが、以上のような観点から、今回 Down 症候群児を対象として尿中遊離アミノ酸分析を試みた。

### 実験方法

#### 実験対象

堺市立養護学校分校の15名、大阪府立百舌鳥学園の6名、大阪府立砂川福祉厚生センターの12名、計33名の Down 症候群児と、対照として、大阪市立日吉小学校の正常学童36名を実験対象とした。

(第1表)

第1表 実験対象

なお、対象とした Down 症候群児は当教室で染色体検索を行った結果、その kariotype は、すべて No. 21 の標準的 trisomy のものである。

対象	年令	才	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	小計	計
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			
Down 症候群児	男子			2	2	4	2	3	4	1		3		21	33名
	女子			1		1	1	1	3	2	1	2		12	
正常学童	男子	3	3	3	3	3	3							18	36名
	女子	3	3	3	3	3	3							18	

また、研究に用いた尿は、早朝空腹時尿を採り、以下の方法で遊離アミノ酸分析を試みた。

### 尿の前処理

#### (1) 樹脂の活性化<sup>(17)</sup>

(a)市販のイオン交換樹脂 Amberlite CG 120 Type 1 (R-Na型) を 500~100ml のビーカーに適量とり、蒸留水を加え、マグネックスターラーで 4~5 回 (1 回 5 分) 充分洗い、

(b)次に 2N-NaOH を加え、同様にスターラーで、2~3 回攪拌後、2N-NaOH を再び加え、約 2 時間スターラーで攪拌する。

(c)次に 2N-NaOH を捨て、蒸留水で、ほぼ中性になるまでメチルレッド試験紙で調べながら充分洗う。

(d)次に 2N-HCl で 2~3 回樹脂を攪拌洗滌後、さらに 2N-HCl を加え、約 3 時間スターラーで攪拌する。

(e)次に 2N-HCl を捨て、中性になるまで蒸留水で充分洗う。

#### (2) 脱塩操作

上述の如く活性化した樹脂に、クレアチニン 7mg 相当量の尿を流す。

#### (a)クレアチニンの定量<sup>(18)</sup>

尿 0.1ml に飽和ピクリン酸 2ml, 10% 苛性ソーダ 0.4ml を加え、水で総量を 20ml とし、暗所室温で 30 分放置後、520mμ における吸光度を比色計で測定する。ブランクとして尿のかわりに水を用いたピクリン酸、苛性ソーダの混合液を用い、標準液としてクレアチニン 10mg/100ml 溶液 1ml を用いる。

#### (b)実施<sup>(18)</sup>

直径 1cm のクロマト管に、先に活性化した樹脂を充填し、樹脂柱の高さを 3cm とし、蒸留水を流して、溶出液がほぼ中性となった後、先にも述べた如く、クレアチニン 7mg 相当量の尿を通す。尿が通りおわると、溶出液が中性になるまで蒸留水で樹脂柱を洗い、ついで 4N アンモニア (市販の濃アンモニア水を水で 4 倍にうすめる) とエタノールを 1:1 に混合したものを 6ml 添加し、カラムから流出する液を容器に集め、これを減圧濃縮、乾固した後、再び蒸留水に溶かして展開に使用した。

### 尿遊離アミノ酸の展開ならびに同定

薄層クロマトグラフィーは、一次元を石炭酸・水 (75:25) で、二次元を、n-ブタノール・醋酸・水 (60:20:20) にて展開した。手技の詳細ならびにスポットの同定は別著<sup>(4)</sup>に記載した如く行な

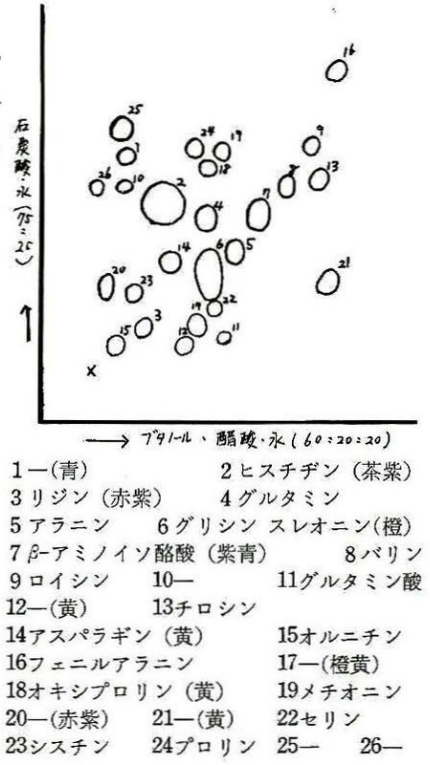
った。

## 実験結果

尿中に検出された全ニンヒドリン陽性スポットの薄層クロマトグラムを第1図に示した。末同定の

第2表 尿中遊離アミノ酸検出率 (%)

スポット 番号	アミノ酸	Down 症候群児 (33例)		正常学童(36例)	
		例数	検出率	例数	検出率
1	— (青)	12例	36.4%	8	22.2
2	ヒスチジン	33	100	35	97.4
3	リジン	33	100	36	100
4	グルタミン	33	100	36	100
5	アラニン	30	91.0	33	91.5
6	グリシン, スレオニン	33	100	36	100
7	$\beta$ -アミノイソ酪酸	16	48.5	15	41.7
8	バリン	13	39.4	9	25.0
9	ロイシン	11	33.4	3	8.3
10	—	25	75.6	23	64.0
11	グルタミン酸	3	9.2	1	2.8
12	—	9	27.3	3	8.3
13	チロシン	4	12.2	2	5.5
14	アスパラギン	20	60.6	25	64.5
15	オルニチン	16	48.5	7	19.5
16	フェニルアラニン	4	12.2	1	2.8
17	—	20	60.6	13	36.2
18	オキシプロリン	4	12.2	—	—
19	メチオニン	3	9.2	—	—
20	—	25	75.6	13	36.2
21	—	5	15.3	1	2.8
22	セリン	7	21.2	25	64.5
23	シスチン	9	27.3	5	15.9
24	プロリン	5	15.3	1	2.8
25	—	30	91.0	32	89
26	—	6	18.4	10	27.8

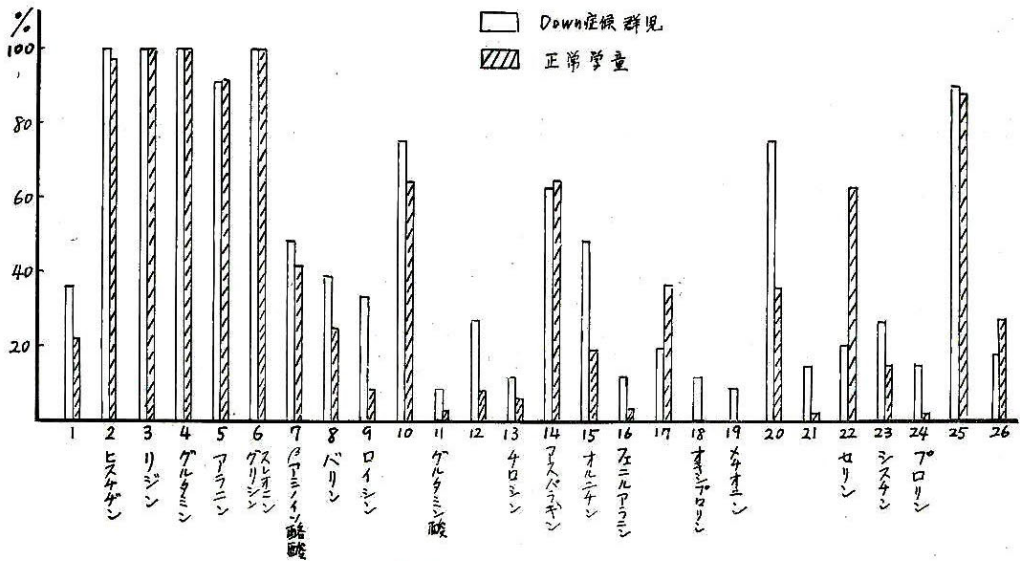


第1図 人尿の薄層クロマトグラムに現われたニンヒドリン陽性スポット

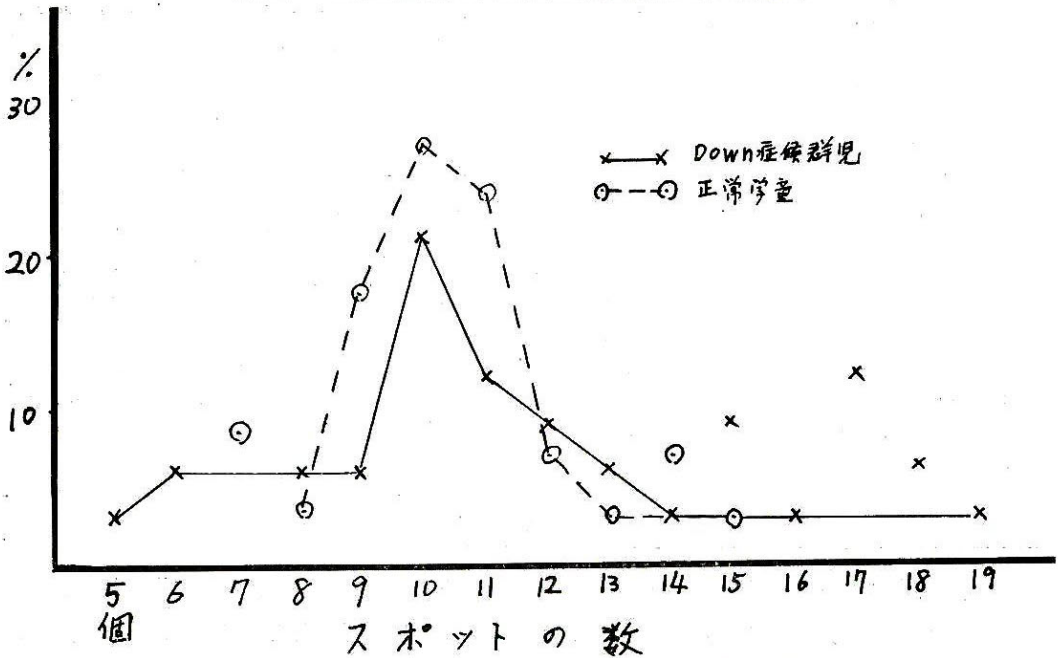
ものも含めて各スポットに通し番号を附した。各スポットの出現頻度を正常学童と比較しながら検討した結果は第2表、第2図に示す如くで、Down 症候群児、正常学童とともに、ヒスチジン、リジン、アラニン、グルタミン、グリシンが、ほとんどの例に検出され、スポット番号 No. 10, No. 14, No. 17, No. 20, No. 25も50%近く、あるいはそれ以上の例に検出された。その他のアミノ酸についても両群間に目立った差はなく、Down 症候群児全例に共通するパターンというものは、つかみ得なかった。しかし、正常学童にくらべて、ほとんどのアミノ酸が、Down 症候群においてその検出率が高かった。

第3表と第3図は尿中遊離アミノ酸の出現数とその頻度を示したものである。Down 症候群児、正常学童ともに10個のスポットを認めたものが最も多く、Down 症候群児では、全体の21.1%で、正常





第2図 Down症候群児と正常学童尿中遊離アミノ酸検出率



第3図 Down症候群児と正常学童の尿中遊離アミノ酸出現数

学童では27.8%の頻度であった。しかし、正常学童では出現数の頻度は正規分布を示し、9個から12個のスポットを認めたものが全体の75%であったのに対し、Down症候群児では48.4%で15個、17個のスポットを認めたものが、それぞれ1割ほどあった。スポットの出現数を12個以下、13個以上にわけ、その頻度をDown症候群児と正常学童とを比較した結果は第4表に示す如くで、13個以上認めたものが正常学童では13.9%であったのに対し、Down症候群児では42.4%もあり、Down症候群児ではHyperaminoaciduriaの頻度が大である傾向が認められた。また、Down症候群児について、

第3表 尿中遊離アミノ酸の出現数

対象 スポット出現数	Down 症候群児 (33例)		正常学童(36例)	
	例数	頻度	例数	頻度
5個	1例	3.0%	—	—
6	2	6.1	—	—
7	—	—	3	8.3
8	2	6.1	1	2.8
9	2	6.1	6	16.7
10	7	21.1	10	27.8
11	4	12.1	9	2.5
12	3	9.1	2	5.5
13	2	6.1	1	2.8
14	1	3.0	2	5.5
15	3	9.1	1	2.8
16	1	3.0	1	2.8
17	4	12.1		
18	2	6.1		
19	1	3.0		

第4表 Down 症候群児と正常学童比較

年令 スポット出現数	Down 症候群児 (33例)		正常学童(36例)	
	例数	頻度	例数	頻度
12個以下	19例	57.6%	31	81.1
13個以上	14	42.4	5	13.9

第5表 年令とアミノ酸尿

年令 スポット出現数	11才以下(13例)		12才以上(20例)	
	例数	頻度	例数	頻度
12個以下	6例	46.2%	13	65
13個以上	7	53.8	7	35

年令を小学生と中学生、すなわち11才以下と12才以上とに分けてみると、出現スポット数13個以上のものが、11才以下では53.8%、12才以上では35%であり、年令の低い方が、さらにHyperaminoaciduriaの頻度が大である傾向を認めた。(第5表)

## 考 按

Down症候群は、染色体数の異常によって起る精神薄弱であり、染色体 No.21が1本余分にあることにより、酵素の過剰あるいは欠損ひいてはアミノ酸代謝の乱れを予想したが、本実験では尿中遊離アミノ酸排泄像において Down 症候群児に共通する特異なパターンは認められず、極めて特異的な共通した障害をうけているとは思われない。一方、Carver<sup>(19)</sup> らは Down 症候群児では、わずかに Hypoaminoaciduria であったと報告しているが、本実験では、むしろ Hyperaminoaciduria の傾向がみられた。Down 症候群における尿中遊離アミノ酸に関して研究した報告は少なく、結論を出すにはさらに、今後の研究が必要である。

WrightとFink<sup>(11)</sup> はペーパークロマトグラフィーにより、 $\beta$ -アミノイソ酪酸の高排泄者の頻度が正常者やその他の精薄者にくらべて高いことを示した。すなわち、正常者では7%、他の精薄者では17%であったのに対し、Down 症候群児では43%であったと報告している。一方Perry<sup>(12)</sup> は、尿中 $\beta$ -アミノイソ酪酸がクレアチニン1mgあたり70 $\mu$ g以上の高値を示したものは正常者で5%、他の精薄者で7%、Down 症候群児では4%で、Down 症候群において、 $\beta$ -アミノイソ酪酸の排泄が、特に高いということはないと結論している。Goodman<sup>(13)</sup> もまた Down 症候群における $\beta$ -アミノイソ酪酸尿の確実な定量によって正常人とかわらないことを示している。

$\beta$ -アミノイソ酪酸は Crumpler および Dent<sup>(20)</sup> によって人尿中から発見された非蛋白性のアミ

ノ酸である。このアミノ酸を大量に排泄する者は、欧米の報告<sup>(20) (21)</sup>では健康人の4.5~10%にみられるといわれるが、東洋人ではその排泄頻度が高く、寺尾<sup>(22)</sup>は45%におよんだと報告している。 $\beta$ -アミノイソ酪酸の尿中排泄は一部、遺伝的な因子で規制される。すなわち、高排泄者は常染色体劣性遺伝子の Homozygous であると考えられている。一方、 $\beta$ -アミノイソ酪酸尿は白血病<sup>(23)</sup>、癌<sup>(24)</sup>、結核<sup>(24)</sup>、鉛中毒<sup>(25)</sup>、発育遅延<sup>(6)</sup>、放射線照射後<sup>(26)</sup>等にも高率にみられるという。

本実験においては、その検出率は、Down症候群児では48.5%、正常学童では41.7%で、両群間にほとんど差がなく、ともに一般東洋人の頻度と同じく高率であった。先にも述べた如く、Wright と Fink<sup>(11)</sup>は $\beta$ -アミノイソ酪酸の高排泄者の頻度を、Down 症候群において、43%という値を出している。これは Perry<sup>(12)</sup>や Goodman<sup>(13)</sup>らにより否定されてはいるが、Down 症候群の顔貌が東洋人に似ているということは、東洋人のもつある遺伝子が人種をこえて Down 症候群にあるのではないかということも考えられる。

尿中タウリンは、一般に広く排泄されるけれど、最近、Wainer<sup>(14)</sup>は Down 症候群では、タウリンの排泄が有意に低く、クレアチニン1gあたり20mg以下の低タウリン排泄者の頻度が正常者で10%、Down 症候群では57%、一方クレアチニン1gあたり70mg以上の高排泄者は正常者で30%、Down 症候群では6%であったと報告しているが、本実験では、タウリンは尿の前処理中に失われるので観察することができなかった。

## 要 約

Down 症候群児33名と正常学童36名について尿中遊離アミノ酸の薄層クロマトグラフィーを行った。その結果

- (1) Down 症候群児全例に共通する特異なパターンというものは掴み得なかった。
- (2) ニンヒドリン陽性スポットの出現数が、9~12個認めたものが正常学童では全体の75%であったのに対し、Down 症候群児では48.4%で、ばらつきがあった。
- (3) スポット数13個以上認めたものは学童では13.9%であったのに対し、Down 症候群児では全体では42.4%、11才以下では53.8%で、Down 症候群において、Hyperaminoaciduria を暗示する結果を得た。

稿を終るに臨み、直接御指導、御校閲を賜った山本勝朗教授に深甚なる謝意を表します。また材料の採取に際し、御協力をいただいた堺市立養護学校の国沢宮子先生、大阪府立百舌鳥学園の広安節子先生、大阪府立砂川福祉厚生センターの職員諸氏ならびに日吉小学校の諸先生に謝意を表します。

## 文 献

- (1) Down, J. L. : London Hospital Reports, 111 : 259, (1866)
- (2) Lejeune, J., Cautier, M and Turpin, R. : C. R. Acad. Sci. (Paris), 248, 1721 (1959)
- (3) Jacobs, P. A., Baikie, A. G., Court Brown, W. M. and Strong, J. A. : Lancet, 1, 710 (1959)
- (4) 平野久美子 : 阪市大家紀12, 115 (1964)



- (5) 車田孝夫：日本小児科学会雑誌67, 686 (1963)
- (6) Berry, H. K. : metabolism, 9, 363 (1960)
- (7) Wright, S. W., Tarjan, G. : Am. J. Dis. child., 93, 405 (1957)
- (8) Westall, R. G., Dancis, J. and Mijler, S. : Am. J. Dis. Child., 94, 571 (1957)
- (9) Allan, J. D., Cusworth, D. C. and Wilson, V. K. : Lancet, No. 7013, 182 (1958)
- (10) Westall, R. G. : Biochem. J., 77, 135 (1950)
- (11) Wright, S. W. and Fink, K. : Am. J. Mental Deficiency 61, 530 (1957)
- (12) Perry, T. L., Shaw, K. W. F. and Walker, D. : nature, 184, 1970 (1959)
- (13) Goodman, H. O., King, J. S. JR., Thomas, J. J., : nature, 204, 650 (1964)
- (14) Wainer, A., King, J. S. JR., H. O. Goodman and Thomas, J. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 121, 212 (1966)
- (15) O'Brien, D. and Groshek, A. : Arch. Disease. Childhood, 37, 17 (1962)
- (16) Perry, T. L. : Science, 136, 879 (1962)
- (17) 吉田稔男, 多田啓也, 森川利夫, 小笠原二郎, 安藤敏幸, 皆川明文, 和田義郎, 佐藤巖郎：臨小医13(4), 194 (1965)
- (18) 佐野勇編：精神薄弱の原因, (金原出版社), 230 (昭和41年)
- (19) Carver, M. J., Dutch, S. J., Paska, P. and Wittson, C. L. : metabolism, 11, 357 (1962)
- (20) Crumpler, H. R., Dent, C. E., Harris, H. and Westall R. G : Nature, 167, 307 (1951)
- (21) Harris, H : Ann. Eugenics, 18, 43 (1953)
- (22) 寺尾寿夫：精神神経学雑誌, 62, 2061 (1960)
- (23) Fink, K., Henderson, R. S. and Fink, R. M : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 78, 135 (1951)
- (24) 石原一郎, 小森義隆, 横尾百合子：医学と生物学, 29, 50 (1953)
- (25) Wilson, V. K., Thomson, M. L. and Dent, C. E. : Lancet, 265, 66 (1953)
- (26) Rubini, I. R., Cronkite, E. P., Bond, V. P. and Flidner, T. M. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100, 130 (1959)

### Summary

Free amino acid patterns in urine of 33 normal children and of 36 with Down's syndrome have been studied by thin layer chromatography.

The results were as follows :

- (1) No specific pattern for Down's syndrome was found.
- (2) The numbers of ninhydrin positive spots ranging from nine to twelve were detected in 75.0% of normal children, on the other hand, in 48.0% of Down's syndrome.

The number of spots detected varied considerably in Down's syndrome compared with the normal.

- (3) More than 13 spots of ninhydrin positive were detected in 13.9% of normal children, and in 42.4% of Down's syndrome. The data suggested a high probability of hyperaminoaciduria in Down's syndrome.